Ž. Srdić et H. Gloor. — Le rôle hématopoïétique des glandes lymphatiques de *Drosophila hydei* [1].

Laboratoire de Génétique, Université de Genève.

Abstract

In *Drosophila hydei*, the so-called lymph gland is shown to be the exclusive source of oenocytoid cells (= lamellocytes). Inasmuch as in Insect hematology these cells are considered to be true elements of the circulating hemolymph, the gland is thus a hemopoïetic organ. Oenocytoid hemocytes appear for the first time in third-instar larvae at the age of 150 h. They increase in numbers toward the end of the larval period, but the bulk of the cells is discharged during metamorphosis whereby the organ disappears. The lymph gland appears to be essentially a pupal organ. The function of oenocytoid hemocytes and thus of the organ remains to be elucidated.

Introduction

L'appareil circulatoire des Insectes comprend le vaisseau dorsal (cœur) qui se prolonge antérieurement par l'aorte. La pulsation cardiaque est assurée par les muscles aliformes et les muscles longitudinaux du vaisseau dorsal. Le diaphragme dorsal facilite l'arrivée de l'hémolymphe dans le sinus péricardial. Le long du cœur et de l'aorte sont disposées des deux côtés de très larges cellules péricardiales (néphrocytes) ainsi que des amas plus ou moins réguliers de petites cellules. Ce dernier élément a été désigné, selon les auteurs, organe ou tissu péricardial, aortique, phagocytaire, hématopoïétique, etc...

Chez *Drosophila*, cet organe est connu sous le nom de « glande lymphatique ». Il comprend trois paires d'îlots cellulaires situées des deux côtés de l'aorte (fig. 1). Des fonctions fort variées sont attribuées à cet organe par divers auteurs. Ainsi Stark et Marshall (1930), Robertson (1936), Bairati (1964) considèrent la glande comme organe phagocytaire ou hématopoïétique. En plus, Bairati (1964) suppose que le fluide de l'hémolymphe est sécrété par cette glande. Shatoury (1955) réfute toute éventuelle fonction hématopoïétique. Shatoury et Waddington (1957*a*, *b*) suggèrent que les cellules (oikocytes) libérées par la glande auraient une fonction endocrine, nécessaire pour la métamorphose des primordia imaginaux.

Les cellules sanguines (hémocytes) de la larve de *Drosophila* ont fait l'objet de plusieurs études (Rizki 1953, 1956, 1957*a*, *b*; Nappi 1970*a*, *b*, 1975). Ces études n'établissent pas de relations entre les hémocytes circulants et la glande lymphatique. Cependant, Waddington (1956) suggère une homologation des divers types cellulaires de la glande, identifiés par Shatoury (1955), avec les hémocytes du sang circulant, décrits par Rizki (1956).

[1] Travail subventionné par le Fonds National suisse de la recherche scientifique; requête N° 3.792-0.76.

Une étude sur les hémocytes de *D. hydei* (Srdić et Gloor, en préparation) a permis de définir chez cette espèce cinq catégories principales de cellules, à savoir: prohémocytes, plasmatocytes, granulocytes, cellules à sphérules et œnocytoïdes. A l'exception des œnocytoïdes, ces hématocytes tirent probablement leur origine directement du mésoderme embryonnaire (Demerec 1950; Jones 1962, 1970; Arnold 1974). Les œnocytoïdes, quant à eux, proviennent de la glande lymphatique, comme les observations rapportées ci-dessous le démontrent.

Matériel et méthodes

Les observations ont été faites sur une souche sauvage (Alicante) de *D. hydei*, maintenue en laboratoire depuis 1967. L'élevage des larves se fait dans un milieu standard (semoule de maïs et de blé, sucre, levure sèche, agar, acide proprionique) à la température de 25° ± 0,5° C. Le développement larvaire dure 170 h environ (Berendes 1965). Quelques observations ont été faites parallèlement sur *D. melanogaster*, dans les mêmes conditions.

Le comptage des hémocytes a été fait au contraste de phase sur des échantillons mélangés d'hémolymphe fraîche provenant de plusieurs larves. Les hémocytes sont comptés dans une goutte de sang, suffisamment large pour remplir l'espace entre la lame et une lamelle de 18 × 18 mm. Selon l'âge larvaire, le sang de quatre à vingt larves est nécessaire pour une telle préparation. Sur une préparation les hémocytes ont été comptés par dix passages indépendants sous un objectif 40 ×, allant d'un bord de la lamelle à l'autre. Ainsi, l'échantillon pris en considération correspond à 19% du volume total couvert par la lamelle. Dans les expériences de transplantation, le nombre de passages par préparation a été doublé.

La capacité de phagocytose a été examinée par l'injection d'une solution de bleu trypan, d'encre de Chine, ou d'une suspension de cellules de levure tuées dans l'autoclave et colorées par du bleu trypan.

Les ligatures sont effectuées au moyen de poils fins, sur des larves de 145 h. Dans les cas réussis (10% environ), le sang est examiné 24 h plus tard.

Les glandes lymphatiques provenant de larves de 170 h sont transplantées dans des hôtes du même âge, dont le sang est examiné 8 h après l'injection.

Résultats

La glande lymphatique est composée de trois paires d'îlots cellulaires disposés de chaque côté de l'aorte (fig. 1). Les paires d'îlots sont séparées l'une de l'autre par une paire de cellules péricardiales. Ces dernières semblent être au nombre constant de vingt paires chez les larves de *Drosophila*, dont nous avons examiné plusieurs espèces.

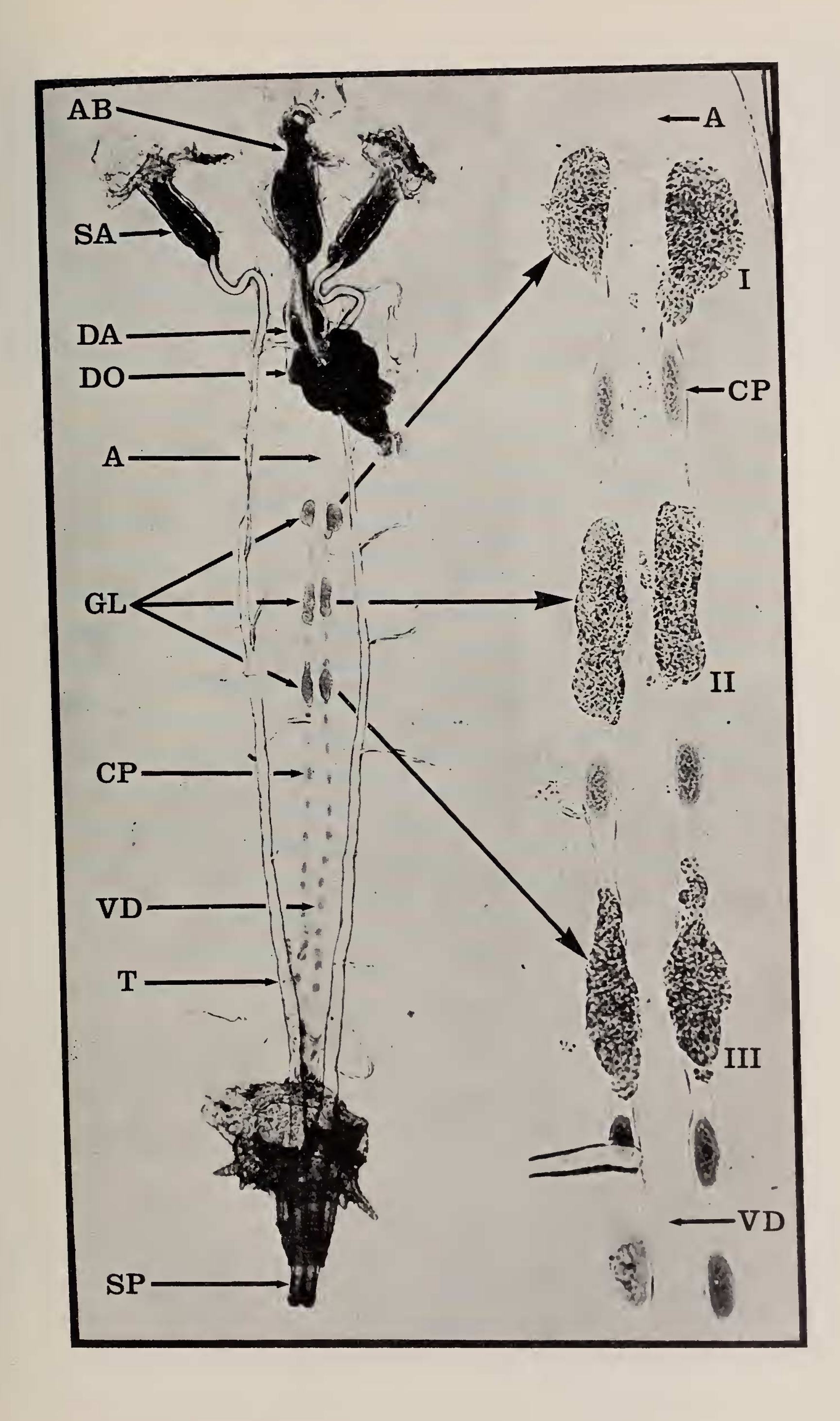
Dans les jeunes larves de *D. hydei*, immédiatement après l'éclosion, les îlots sont composés de quelques cellules seulement. Durant la vie larvaire, la glande grandit

---

Fig. 1.

Anatomie de la glande lymphatique de *D. hydei*. La préparation montre, à 2 agrandissements différents, la répartition des 3 paires d'amas cellulaires (I, II, III) de la glande dans une larve avancée (170 h, longueur totale 6 mm). Fixation Bouin, coloration Feulgen.

A aorte, AB appareil buccal, CP cellules péricardiales, DA disque d'antenne, DO disque d'œil, GL glande lymphatique, SA stigmate antérieur, SP stigmate postérieur, T trachée, VD vaisseau dorsal.


AB
SA
DA
DO
A
GL
CP
VD
T
SP
A
I
CP
II
III
VD

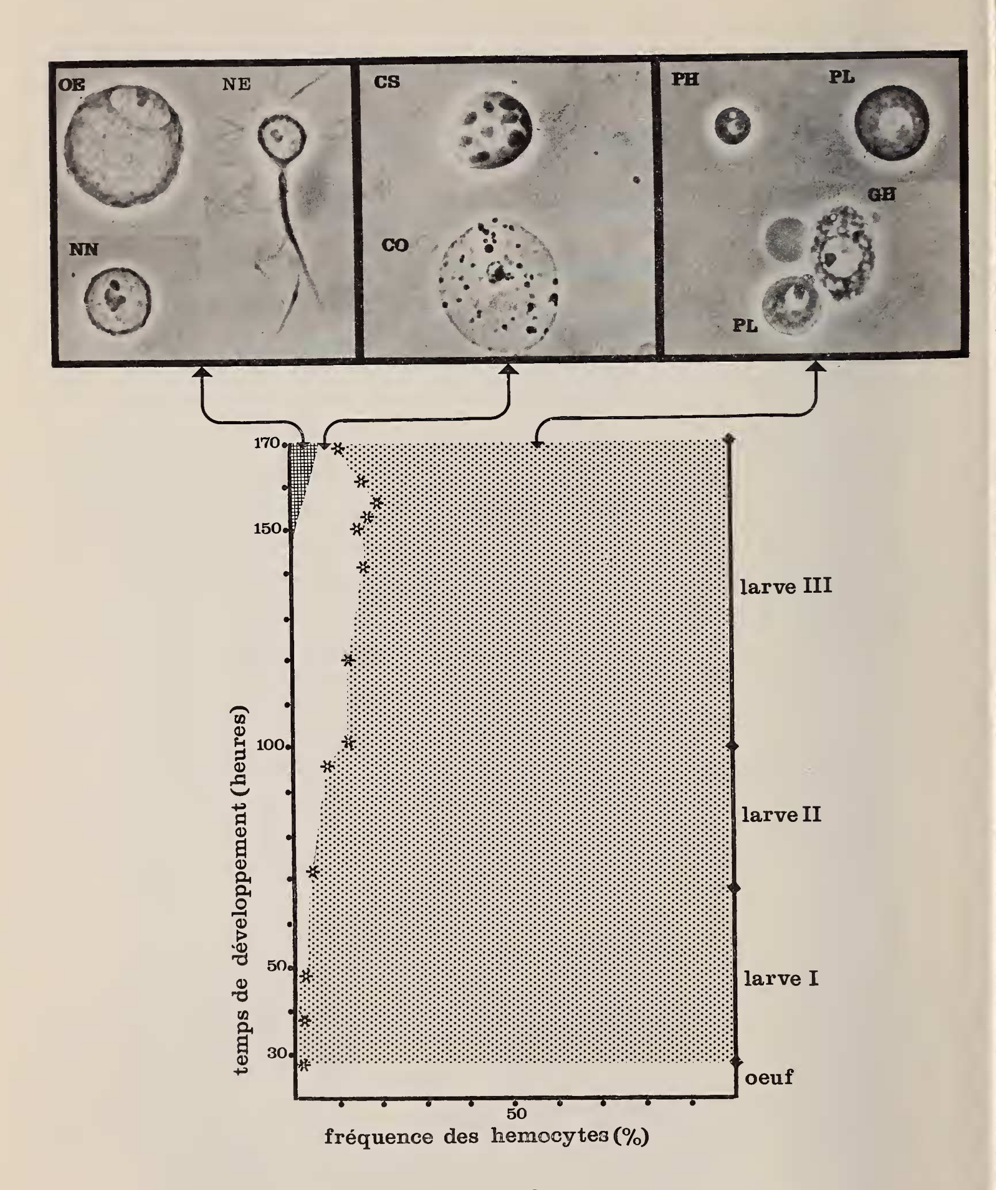


Fig. 2.

Les types principaux des hématocytes chez *D. hydei*, avec quelques stades de transformation. En bas, la fréquence relative des œnocytoïdes et des cellules à sphérules, comparée avec celle des autres types mis ensemble, dont le plus important numériquement est le plasmatocyte. Chaque astérisque représente la moyenne de 10 comptages.

CO coagulocytes, CS cellules à sphérules, GH granulocytes, NE nématocytes, NN « noyaux nus », Œ œnocytoïdes, PH prohémocytes, PL plasmatocytes.

progressivement. Des mitoses s'observent à tous les stades, mais elles sont particulièrement fréquentes pendant la première moitié du troisième stade larvaire. La glande atteint sa taille maximale juste avant la pupaison. Elle se décompose entièrement pendant la métamorphose en libérant dans l'hémocèle pupal un seul type de cellules, les œnocytoïdes.

Jusqu'à l'âge de 130 h, correspondant à peu près à la moitié du troisième stade larvaire (fig. 2), la glande ne contient qu'un seul type cellulaire. Ces cellules ont un cytoplasme grossièrement granuleux avec de nombreuses vacuoles. A partir de 135 à 140 h de développement, un deuxième type de cellules apparaît dans la glande lymphatique. L'examen des éléments du sang circulant montre que le même type de cellules se retrouve dans le sang des larves à partir de 150 h environ, 24 h avant la pupaison (fig. 2). Il s'agit d'une catégorie d'hémocytes qui est connue sous le nom de cellules œnocytoïdes (HOLLANDE 1911), ou encore sous le nom de lamellocytes (RIZKI 1957*a*). Ces observations suggèrent que les œnocytoïdes du sang proviennent de la glande lymphatique. Nous avons essayé de vérifier cette hypothèse par trois types d'expériences.

Tout d'abord, l'injection dans des larves de troisième stade moyen ou avancé, de bleu trypan, d'encre de Chine et de cellules de levure colorées par le bleu trypan, a révélé que les cellules de la glande lymphatique de même que les œnocytoïdes du sang n'ingèrent ni le colorant ni les particules microscopiques. Par contre, les autres hémocytes ingèrent les deux (tandis que les cellules péricardiales ne prennent que le colorant). Cette similarité physiologique entre les cellules de la glande et les œnocytoïdes s'ajoute aux similarités nettes sur le plan morphologique, y compris les affinités aux colorants histologiques (Giemsa).

Ensuite, des ligatures ont été effectuées sur des larves âgées de 140 à 145 h, juste avant la décharge présumée des œnocytoïdes de la glande. Les ligatures ont été placées légèrement postérieurement à la moitié du corps, au niveau des segments 8/9 pour s'assurer que la totalité du complexe « glande lymphatique » soit située dans la partie antérieure. Cette opération a été mal supportée par les larves. Parmi de nombreuses expériences, il n'y eut qu'une dizaine de cas parfaitement réussis où les deux parties du corps ont survécu plus de 24 heures. Dans ces cas, sans exception, l'examen de l'hémolymphe a montré que les cellules œnocytoïdes étaient présentes dans la partie antérieure et absentes dans la partie postérieure. Ce résultat a été entièrement confirmé par de nombreux cas de survie partielle, soit de la partie antérieure, soit de la partie postérieure du corps.

Dans une troisième approche, nous avons transplanté des glandes lymphatiques, prélevées sur des larves âgées de 170 h et injectées avec la solution physiologique (DERKSEN et BERENDES 1970) dans des larves hôtes du même âge. Si la glande est à l'origine des cellules œnocytoïdes circulantes, les larves hôtes devraient, après la transplantation, montrer dans leur sang un surplus de ces cellules. Cette prévision est confirmée par les résultats (fig. 3). Dans les larves non traitées ou injectées avec la seule solution physiologique, les œnocytoïdes représentent 5 à 10% du total des hémocytes. Dans les larves injectées avec un ou deux complexes de glande, ce chiffre monte à 18%, respectivement 33%. En vue de vérifier statistiquement cette augmentation, nous avons choisi, pour la simplicité, le rapport entre les œnocytoïdes et les plasmatocytes, type prédominant parmi les hématocytes (tableau 1). Cette comparaison démontre que la fréquence des œnocytoïdes augmente de 9% environ par glande injectée. L'approximation linéaire, qui tient compte de la tendance d'augmentation proportionnelle au nombre de glandes injectées, est relativement bonne ($P \ll 0,001$), même s'il est évident qu'une variation résiduelle est encore significative au niveau de 5%. Le test appliqué est dû à Cochran et cité par Sachs (1972, p. 365).

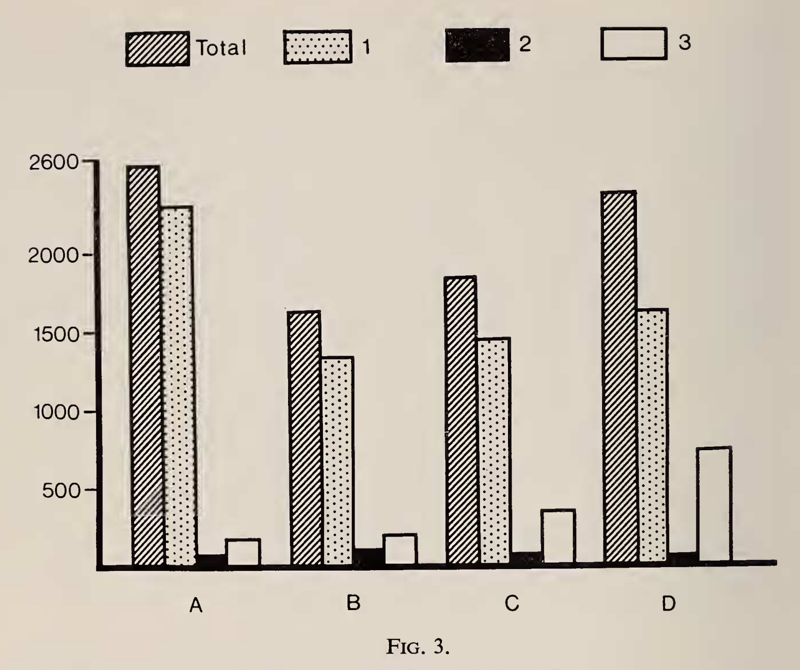


FIG. 3.

Nombre de cellules dans l'hémolymphe de larves âgées de 170 h. Les hémocytes sont séparés en 3 groupes arbitraires: 1. prohémocytes, plasmatocytes et granulocytes. 2. cellules à sphérules et coagulocytes. 3. œnocytoïdes (y compris nématocytes et «noyaux nus», voir Fig. 3).

Chaque comptage est fait sur le sang de 4 larves, mis en commun et chacun des groupes A-D représente la moyenne de 20 comptages. On remarque, dans les groupes B-D la diminution de la catégorie principale (1), due à une perte de sang pendant l'opération.

A larves non injectées, B larves injectées avec de la solution physiologique, C larves hôtes ayant reçu une glande supplémentaire, D larves hôtes ayant reçu deux glandes supplémentaires.

DISCUSSION

Le sang circulant de *D. hydei* contient cinq types principaux de cellules (SRDIC et GLOOR, en préparation): prohémocytes, plasmatocytes, granulocytes, cellules à sphérules et œnocytoïdes (fig. 3). Nous considérons d'autres types d'hémocytes cités dans la littérature hématologique des Insectes et en particulier des Diptères comme des éléments présentant un état physiologique spécial (adipohémocytes, podocytes, coagulocytes) ou un état de transformation morphologique in vitro (nématocytes, hémocytes fusiformes, « noyaux nus »). Plusieurs de ces types sont représentés dans la figure 2. La figure montre d'ailleurs que les hémocytes de toute catégorie font leur apparition à l'éclosion de la larve ou peu après, tandis que les œnocytoïdes se montrent seulement vers la fin de la vie larvaire et ne dépassent pas les 10% du total des hémocytes. Les cellules à sphérules (se transformant rapidement en coagulocytes in vitro) atteignent environ 18% au maximum et semblent disparaître à la métamorphose (fig. 2).

TABLEAU 1.

Epreuve de signification pour l'augmentation de la fréquence des cellules oenocytoïdes en fonction de la présence de glandes lymphatiques supplémentaires (fig. 3). a : Nombres observés. b : Fréquences observées. c : Fréquences selon la meilleure approximation linéaire.

Injections	Plasmatocytes			Oenocytoïdes			Total
	a	b	(c)	a	b	(c)	a
Solution physiologique	1320	87%	(88%)	192	13%	(12%)	1512
Sol. physiol. + 1 glande	1420	81%	(79%)	335	19%	(21%)	1755
Sol. physiol. + 2 glandes	1608	69%	(70%)	719	31%	(30%)	2327

Régression linéaire	χ^2 185,3	1 D.L.	$P \ll 0{,}001$
Déviation de la régression	χ^2 5,0	1 D.L.	$0{,}01 < P < 0{,}05$
Total	χ^2 190,3	2 D.L.	$P \ll 0{,}001$

Ainsi, les œnocytoïdes se distinguent des autres types d'hémocytes par leur apparition tardive, une vingtaine d'heures seulement avant la pupaison. Cette particularité est liée au fait que l'origine des œnocytoïdes est indépendante de celle des autres hémocytes. En effet, l'étude histologique et les expériences de ligature et de transplantation ont démontré que les œnocytoïdes prennent leur origine dans la glande lymphatique, malgré que nous n'ayons pas réussi à fournir la preuve directe par l'ablation de l'organe.

Ces résultats ne concordent pas avec ceux de RIZKI (1953, 1956, 1957*a*, *b*) et NAPPI (1975) qui considèrent que chez *D. melanogaster* les plasmatocytes se transforment progressivement en œnocytoïdes (= lamellocytes) en passant par les podocytes. Contrairement à ces auteurs, nous constatons que les œnocytoïdes proviennent de la glande et que celle-ci ne libère que ce seul type cellulaire. D'ailleurs, ni les éléments de la glande in situ ni les œnocytoïdes libres ne sont capables de phagocytose, contrairement à ce que suggèrent STARK et MARSHALL (1930), ROBERTSON (1936) et BAIRATI (1965). En outre, l'examen de l'hémolymphe de nombreuses larves de tout âge n'a pas permis de confirmer les résultats de SHATOURY (1955), SHATOURY et WADDINGTON (1957*a*, *b*) qui considèrent que la glande libère des « oikocytes » aussi bien chez les jeunes larves que chez les larves âgées.

Le développement de la glande lymphatique, l'apparition tardive des œnocytoïdes dans le sang circulant et le fait que la glande disparaît en libérant la totalité de son contenu dans l'hémocèle pupal indiquent que cette glande est essentiellement un organe pupal. Même si les œnocytoïdes (lamellocytes, oikocytes) avaient un rôle d'encapsulation (NAPPI 1975), s'ils étaient à l'origine des « tumeurs mélaniques » larvaires (RIZKI 1957*b*, 1960), ou encore s'ils sécrétaient l'hémolymphe (BAIRATI 1964), le rôle principal de ces cellules et par conséquent de la glande elle-même ne serait pas lié à la vie larvaire, mais

plutôt à la période de métamorphose. Shatoury et Waddington (1957*a*) ont d'ailleurs déjà suggéré une fonction endocrine, conférant aux primordia une potentialité métamorphique. Cependant, le rôle précis de la glande lymphatique reste encore à déterminer.

Chez d'autres Diptères Cyclorrhaphes un organe comparable à la glande lymphatique des Drosophilidae n'a pas été constaté. Crossley (1964) et Zachary et Hoffmann (1973) décrivent un foyer de multiplication des hémocytes situé à la partie postérieure de la larve de *Calliphora erythrocephala.* Ce foyer, considéré par les auteurs comme un tissu hématopoiétique, n'a rien de comparable avec la glande lymphatique du genre *Drosophila.* Nos observations sur *Calliphora erythrocephala* relèvent que des deux côtés de l'aorte et du vaisseau dorsal chez les larves de cette espèce existe un organe anatomiquement comparable à la glande lymphatique de *Drosophila.* Le rôle physiologique de cet organe cependant semble être la phagocytose, car il se charge très fortement avec le bleu de trypan, le cas jamais constaté avec la glande lymphatique de *Drosophila.*

Nous remercions le D[r] Hansjörg Frei qui a bien voulu se charger de l'examen statistique des résultats.

Résumé

Chez *Drosophila hydei,* la glande lymphatique libère des cellules œnocytoïdes (= lamellocytes) dans l'hémolymphe des larves de troisième stade avancé, c'est-à-dire à partir de 150 h de développement. Ainsi, la glande lymphatique est un organe hématopoïétique, pour autant que les œnocytoïdes soient considérées comme des cellules sanguines (hémocytes) par les hématologues des Insectes. Cet organe produit exclusivement des cellules œnocytoïdes; il disparaît au cours de la métamorphose en déchargeant la totalité de ses cellules. La glande lymphatique doit être considérée principalement comme un organe pupal. Le rôle des œnocytoïdes et par conséquent de la glande lymphatique durant la métamorphose reste à préciser.

BIBLIOGRAPHIE

Arnold, J. W. 1974. The hemocytes of insects. In: Physiology of Insecta (Ed. M. Rockstein). Academic Press, New York and London.

Bairati, A. 1964. L'ultrastruttura dell'organo dell'emolinfa nella larva di *Drosophila melanogaster. Z. Zellforsch.* 61: 769-802.

Berendes, H. D. 1965. Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei. Chromosoma* (Berl.) 17: 35-77.

Crossley, A. C. S. 1964. Experimental analysis of the origins and physiology of haematocytes in the blue blow-fly *Calliphora erythrocephala* (Meig.). *J. Exp. Zool.* 157: 375-398.

Derksen, J. and H. D. Berendes. 1970. Polytene chromosome structure at the submicroscopic level. II. Length distribution of DNA molecules from polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* and *D. hydei. Chromosoma* (Berl.) 31: 468-477.

Demerec, M. (Ed.). 1950. Biology of *Drosophila.* John Wiley & Sons, New York.

Hollande, A. C. 1911. Etudes histologiques comparées du sang des Insectes à hémorrhée et des Insectes sans hémorrhée. *Arch. Zool. exp. gén.* (5[e] Série) 6: 283-323.

Jones, J. C. 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. *Amer. Zoologist* 2: 209-246.

— 1970. Hemocytopoiesis in insects. In: Regulation of hematopoiesis (Ed. A. S. Gordon), Vol. 1: 7-65. Appleton-Century Crofts, New York.

NAPPI, A. J. 1970*a*. Hemocytes of larvae of *Drosophila euronotus* (Diptera, Drosophilidae). *Ann. Entomol. Soc. America* 63: 1217-1224.

— 1970*b*. Defense reactions of *Drosophila euronotus* larvae against the Hymenopterous parasite *Pseudeucoila bochei. J. Invertebrate Pathology* 16: 408-418.

— 1975. Parasite encapsulation in insects. In: Invertebrate immunity (Ed. K. MARAMOROSCH and R. E. SHOPE). Academic Press, New York, San Francisco, London.

RIZKI, M. T. M. 1953. The larval blood cells of *Drosophila willistoni. J. Exp. Zool.* 123: 397-411.

— 1956. Metamorphosis and diapause. In: Physiology of insect development (Ed. F.L. CAMPBELL). Chicago Univ. Press, Chicago.

— 1957*a*. Alterations in the haemocytes population of *Drosophila melanogaster. J. Morphology* 100: 437-458.

— 1957*b*. Tumor formation in relation to metamorphosis in *Drosophila melanogaster. J. Morphology* 100: 459-472.

ROBERTSON, C. W. 1936. The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. *J. Morphology* 59: 351-400.

SACHS, L. 1972. Statistische Auswertungsmethoden, 3. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

SHATOURY, H. H. El. 1955. The structure of the lymph glands of *Drosophila* larvae. *Roux' Arch. Entw.-mech. Organ.* 147: 489-495.

SHATOURY, H. H. El and C. H. WADDINGTON. 1957*a*. Functions of the lymph gland cells during the larval period in *Drosophila. J. Embryol. Exp. Morphology* 5: 122-133.

— 1957*b*. The development of gastric tumours in *Drosophila melanogaster. J. Embryol. Exp. Morphology* 5: 143-152.

STARK, M. B. and A. K. MARSHALL. 1930. The blood-forming organ of the larva of *Drosophila melanogaster. J. American Inst. Homeopathy* 23: 1204-1206.

WADDINGTON, C. H. 1956. Histolysis and tumors. In: Physiology of insect development (Ed. F. L. CAMPBELL). Chicago Univ. Press, Chicago.

ZACHARY, D. and J. A. HOFFMANN. 1973. The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Meig.) (Diptera). *Z. Zellforsch.* 141: 55-73.
